

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. Februar 2006 (09.02.2006)

PCT

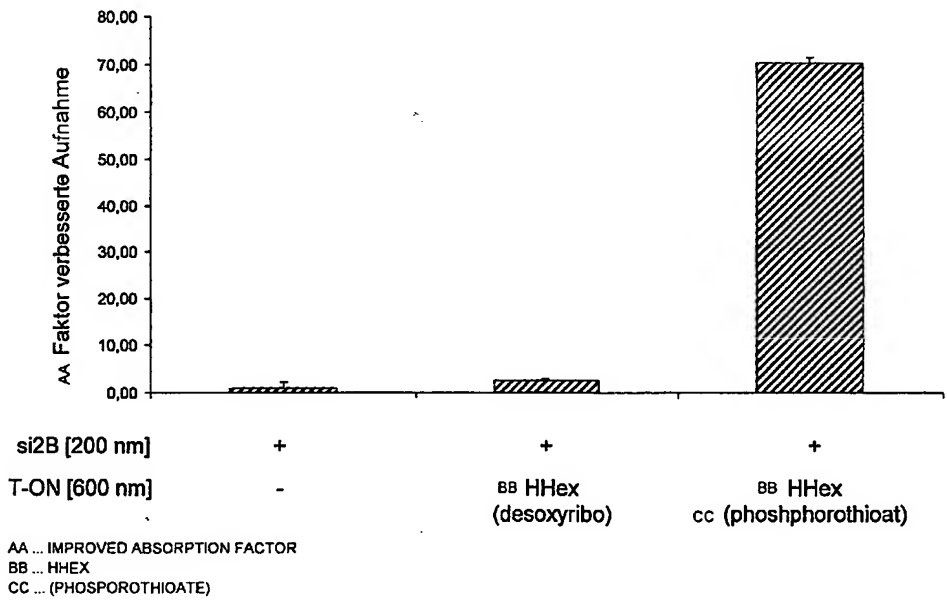
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2006/012896 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation:  
*C12N 15/11* (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)  
*C12N 15/87* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/001404
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
5. August 2005 (05.08.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 038 535.1 6. August 2004 (06.08.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): UNIVERSITAETSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN [DE/DE]; Ratzeburger Allee 160, 23538 Luebeck (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCZAKIEL, Georg
- (74) Anwalt: BOEHMERT & BOEHMERT; BIEHL, Christian, Niemannsweg 133, 24105 Kiel (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CELLULAR TRANSFER OF NUCLEIC ACID MATERIALS

(54) Bezeichnung: ZELLULÄRE EINSCHLEUSUNG VON NUKLEINSÄUREWIRKSTOFFEN



(57) Abstract: The invention relates to using at least one type of first phosphorothioate-modified nucleic acid in order to improve the cellular absorption of at least one type of second nucleic acid. A pharmaceutical preparation for improving the cellular absorption of at least one type of the first nucleic acid comprising at least one type of the second phosphorothioate-modified nucleic acid is also disclosed. Said invention also relates to a method for improving the cellular absorption of the first cell nucleic acid in a cell culture by incubating the cells with the first nucleic acid and at least one type of the second phosphorothioate-modified nucleic acid.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/012896 A1

BEST AVAILABLE COPY



TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung besteht in der Verwendung von wenigstens einer ersten, Phosphorothioatmodifizierten Nukleinsäure zur Verbesserung der zellulären Aufnahme wenigstens einer zweiten Nukleinsäure. Sie betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zubereitung zur Verbesserung der zellulären Aufnahme wenigstens einer ersten Nukleinsäure, bestehend aus wenigstens einer zweiten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure. Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der zellulären Aufnahme einer ersten Nukleinsäure von Zellen in Zellkultur, durch Inkubieren der Zellen mit der ersten Nukleinsäure und wenigstens einer zweiten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure.

### Zelluläre Einschleusung von Nukleinsäurewirkstoffen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der zellulären Aufnahme von Nukleinsäuren in Zellen. Außerdem betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung  
5 zur Verbesserung der zellulären Aufnahme von Nukleinsäuren, insbesondere Nukleinsäurewirkstoffen mit erhöhter Wirkung.

Die Biotechnologie ermöglicht mit ihren molekularbiologischen Methoden die direkte Einflussnahme auf molekulare Mechanismen sehr unterschiedlicher Organismen. Dabei  
10 stehen Steuerungs- und Optimierungsprozesse zellulärer Leistung, z.B. bei Mikroorganismen und Pflanzen, die gezielte Steuerung phänotypischer Ausprägungen, die Unterdrückung pathogener Genexpression wie auch die therapeutische Anwendung in der Human- und Veterinärmedizin im Vordergrund. Neben dem Einfügen zusätzlicher genetischer Information in das Genom eines Organismus (Gentherapie) wird insbesondere in der Humanmedizin die  
15 Entwicklung von therapeutischen Oligonukleotiden vorangetrieben. Insbesondere dann, wenn Krankheitsbilder mit fehlgesteuerter, weit erhöhter Genexpression oder viraler Genexpression korreliert ist, können oligomere Nukleinsäure-Wirkstoffe erfolgreich als Therapeutikum angewandt werden. Die aussichtsreichsten Klassen oligomerer Nukleinsäure-Wirkstoffe schließen Antisense-Oligonukleotide, doppelsträngige RNA (siRNA) und Ribozyme ein aber  
20 auch andere Klassen sind potenzielle Wirkstoffe, wie zum Beispiel Aptamere, Spiegelmere, immunstimulatorische Oligonukleotide und decoys. Die Verwendung von Oligonukleotidwirkstoffen besitzt gegenüber der Gentherapie den Vorteil, dass lediglich in die Genexpression, nicht aber in das Genom selbst, eingegriffen wird bzw. „klassische drug targets“ durch den Wirkstoff erkannt, gebunden und inhibiert werden. Die ethischen  
25 Bedenken und zulassungsrechtlichen Anforderungen an Oligonukleotidwirkstoffe sind dadurch gegenüber dem Verfahren der Gentherapie wesentlich geringer.

In der klinischen Forschung werden gegenwärtig verschiedene Ansätze zur Entwicklung von Oligonukleotidwirkstoffen verfolgt. Die am intensivsten untersuchten Wirkstoffe sind  
30 Antisense-Oligonukleotide, immunstimulatorische CpG-Oligonukleotiden und siRNA. Antisense-Oligonukleotide sind einzelsträngige, kurzkettige Nukleinsäuremoleküle, die aufgrund ihrer spezifischen Sequenz über komplementäre Basenpaarung an die RNA ihres Targets binden und so die Expression des entsprechend kodierten Zielproteins hemmen. Die

immunstimulatorische Wirkung von CpG- Oligonukleotiden hingegen beruht auf der Erkennung nicht-methylierter Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, die charakteristisch für mikrobielle DNA sind. Kurzkettige Doppelstrang-RNA-Moleküle, die die Translation einer Ziel-mRNA posttranskriptionell und sequenzspezifisch hemmen, werden siRNA (small  
5 interfering RNA) und der Vorgang RNA-Interferenz (RNAi) genannt. Vergleichende Wirksamkeitsstudien zwischen siRNA und Antisense-Oligonukleotiden zeigen häufig einen Vorteil für siRNA.

Eines der weitgehend ungelösten, technischen Erfordernisse für die biologische Anwendung  
10 sowie die therapeutische Applikation von Nukleinsäurewirkstoffen ist die zelluläre Einschleusung. Es ist beispielsweise bekannt, dass Antisense-Oligonukleotide von Ziel-Zellen nur in geringem Maße oder nicht messbar spontan aufgenommen werden. Die Aufnahme kann teilweise dadurch verbessert werden, dass bestimmte Trägerstoffe, oft peptidische, lipidische oder kationische organische Substanzen, verwendet werden, die die zelluläre  
15 Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide erhöhen und damit auch die Wirkung der applizierten Antisense-Oligonukleotide verbessern. In Säugetieren und beim Menschen erweisen sich solche Trägerstoffe oft als toxisch und daher nicht anwendbar. Daher besteht insbesondere für die klinische Anwendung von oligomeren Nukleinsäurewirkstoffen der Bedarf an geeigneten Verfahren für deren Einschleusung in Ziel-Zellen und Ziel-Gewebe.  
20 Diese Betrachtung gilt ebenso für andere Anwendungsfelder wie zum Beispiel der Tiermedizin.

Aufgabe dieser Erfindung ist es, ein Verfahren zur zellulären Aufnahme von Nukleinsäuren, insbesondere von Oligonukleotidwirkstoffen und in dieser Gruppe insbesondere für  
25 Doppelstrang-RNA, zu schaffen. Eine weitere Aufgabe ist es, einen Stoff bereitzustellen, der die zelluläre Aufnahme von Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotidwirkstoffen, zum Beispiel in der Form von Antisense-Oligonukleotiden, immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden oder siRNA, erhöht. Schließlich ist es Aufgabe der Erfindung, die Wirkung einer Nukleinsäure, insbesondere eines Oligonukleotidwirkstoffs, zum Beispiel in der Form  
30 von Antisense-Oligonukleotiden, immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden oder siRNA, enthaltenden pharmazeutischen Zubereitung zu verbessern.

- Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass wenigstens eine erste, Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure zur Verbesserung der zellulären Aufnahme wenigstens einer zweiten Nukleinsäure verwendet wird. Die Aufgabe wird auch gelöst durch eine pharmazeutische Zubereitung zur Verbesserung der zellulären Aufnahme einer Nukleinsäure, bestehend aus
- 5 wenigstens einer Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure. Schließlich wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Verbesserung der zellulären Aufnahme einer ersten Nukleinsäure von Zellen in Zellkultur durch Inkubieren der Zellen mit der ersten Nukleinsäure und wenigstens einer zweiten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure.
- 10 Es wurde gefunden, dass Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren die zelluläre Aufnahme anderer Nukleinsäuren, insbesondere doppelsträngige RNA (siRNA), verbessern. Die Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide (Transporter-Oligonukleotide: T-ON) agieren somit als Transporter-Nukleinsäuren, die insbesondere zur Verbesserung der zellulären Aufnahme von Nukleinsäurewirkstoffen oder zur Gentherapie
- 15 verwendet werden können. Die Nukleinsäure selbst kann ein endogen exprimiertes, halbsynthetisches, synthetisches oder chemisch modifiziertes Nukleinsäuremolekül sein, das vorzugsweise Ribonukleotide und/oder Desoxyribonukleotide enthält. Der Begriff „zelluläre Aufnahme“ schließt in diesem Zusammenhang die einzelnen Schritte Transmembran-Transport, subzelluläre Lokalisation und intrazelluläre Mobilität ein. Dabei ist es im Rahmen
- 20 der Erfindung genügend, dass nur einige Phosphate (wenigstens drei) der zur Verbesserung der zellulären Aufnahme anderer Nukleinsäuren verwendeten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren Phosphorothioat-modifiziert sind. Bevorzugt ist jedoch das gesamte Nukleinsäurerückgrat der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren Phosphorothioat-modifiziert.
- 25 Weiterhin wurde gefunden, dass diese Transportaktivität der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren „*in trans*“ für Oligonukleotid-Wirkstoffe unabhängig von der Sequenz der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren erfolgt.
- 30 Entscheidend für die Transportaktivität der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren mit Transportaktivität *in trans* ist das Vorhandensein eines Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäurerückgrates. Die zelluläre Aufnahme der Oligonukleotidwirkstoffe ist von der

Konzentration und der Länge der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure abhängig, nicht jedoch von deren Sequenz.

Einige bevorzugte, beispielhafte Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren sind mit ihrer Sequenz in SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 9 dargestellt. Dabei ist zum Verständnis der Erfindung nur die Abfolge der Nukleotide (Sequenz) dargestellt. Wie bereits erläutert ist erfindungsgemäß bevorzugt das gesamte Nukleinsäure-Rückgrat Phosphorothioat-modifiziert, wenigstens aber an drei Stellen.

Die zu transportierende Nukleinsäure ist dabei besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe von Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen, CpG-immunstimulatorischer DNA, Aptameren, siRNA/RNAi, DNA und RNA und ist bevorzugt ein Nukleinsäurewirkstoff.

Im Rahmen der Erfindung ist es dabei auch möglich die Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren besonders bevorzugt mit einem anderen biologisch aktiven Molekül zu komplexieren oder kovalent zu binden.

Des Weiteren können die erfindungsgemäßen Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren in einem Vektorsystem zur zellulären Einschleusung von Nukleinsäuren verwendet werden.

Zum besseren Verständnis wird die Erfindung im Folgenden anhand von Beispielen und den diese begleitenden Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Quantifizierung der zellulären Aufnahme von siRNA;

Fig. 2 die verbesserte zelluläre Aufnahme von siRNA durch Co-Inkubation mit einer Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure;

Fig. 3 die Unabhängigkeit der siRNA-Aufnahme von der Sequenz des verwendeten Phosphorothioat-Oligonukleotids;

- Fig. 4 die Transportaktivität der Phosphorothioat-Oligonukleotide in Abhängigkeit von der Chemie des Nukleinsäure-Rückgrates der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren;
- 5 Fig. 5 die Konzentrationsabhängigkeit der durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren vermittelten Aufnahme von siRNA;
- Fig. 6 die Abhängigkeit der durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren vermittelten siRNA-Aufnahme von der Länge der Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure;
- 10 Fig. 7 die durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren gesteigerte der zellulären Aufnahme von siRNA in primären humanen Endothelzellen (HUVEC);
- 15 Fig. 8 die apparente biologische Wirksamkeit der ICAM-1-gerichteten siRNA „si2B“ in primären humanen Endothelzellen (HUVEC), die mit der durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren gesteigerten zellulären Aufnahme einher geht (siehe Fig.7);
- 20 Fig. 9 die Strukturvorhersage der mit der in SEQ ID NO: 10 abgebildeten Sequenz einer small hairpin RNA (shRNA), die durch Inkubation mit den erfindungsgemäßen Oligonukleotiden von ECV-304-Zellen verbessert aufgenommen wird (siehe Fig. 10);
- 25 Fig. 10 die durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren gesteigerte Aufnahme von siRNA und der in Fig. 9 gezeigten shRNA in ECV-304-Zellen;
- 30 Fig. 11 die durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren vermittelte Aufnahme von siRNA im Vergleich zur siRNA-Einschleusung durch Transfektion in SKRC-35-Zellen und

Fig. 12 die Steigerung der durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren  
vermittelten Aufnahme von siRNA durch Okadainsäure.

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Quantifizierung der  
zellulären Aufnahme von siRNA in Anwesenheit von Phosphorothioat-Oligonukleotiden (T-  
ON: Transporter-Oligonukleotiden). ECV-304-Zellen wurden gemeinsam mit siRNA (in den  
Beispielen die gegen ICAM-1 gerichtete siRNA „si2B“) und einem Transporter-  
Oligonukleotid über einen Zeitraum von im Allgemeinen 14 h in OptiMEM Medium  
inkubiert. Die zelluläre Aufnahme der siRNA wurde nach sich anschließender RNA-  
Zellextraktion mit Hilfe der Liquid-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde  
(<sup>32</sup>P-sense 2B), anschließender enzymatischer Verdauung (RNase A/T 1) und Auftrennung in  
einem Polyacrylamidgel unter semi-denaturierenden Bedingungen mit einem Phosphor-  
Imager quantifiziert.

Insbesondere wurden in definierter Zellzahl ausgebrachte ECV-304 Zellen nach 18 h mit den  
Inkubationslösungen, bestehend aus siRNA und T-ON in OptiMEM, überschichtet und für  
unterschiedliche Zeiträume bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die RNA-Extraktion  
über eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die gewonnene RNA wurde in 30 µl einer  
Hybridisierungslösung (100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4) resuspendiert und ein  
Aliquot dieser Lösung mit 40 fmol <sup>32</sup>P-sense-2B hybridisiert. Anschließend erfolgte eine  
RNase Verdauung mit 40 ng RNase A und 0,1 U T1 (MBI) für 10 min bei 30 °C. Diese  
Lösung wurde mit Probenpuffer (7M Urea, 50% Glycerin in 1xTBE) versetzt und auf ein semi-  
denaturierendes PAA-Gel mit 4 M Urea aufgetragen. Die Auswertung der Bandenintensitäten  
des Gels erfolgte mittels eines Phosphor-Imagers.

25

In dem in Fig. 2 abgebildeten Beispiel wird gezeigt, dass die zelluläre Aufnahme von siRNA  
durch Co-Inkubation mit einem Phosphorothioat-Oligonukleotid erheblich verbessert wird.  
Im Rahmen der Erfindung wurde dazu eine Anzahl von 300.000 ECV-304-Zellen mit 200 nm  
si2B allein, mit zusätzlich 600 nM HHex als Oligodesoxyribonukleotid bzw. 600 nm HHex  
als Phosphorothioat-modifiziertes Oligodesoxyribonukleotid über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>  
in OptiMEM-Medium inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie in der Figurenbeschreibung zu  
Fig. 1 erläutert.



Während die Zugabe von 600 nm des Desoxyribonukleinsäure-Oligonukleotids HHex keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme der siRNA si2B ausübt, zeigt die Phosphorothioat-modifizierte Variante von HHex (SEQ ID NO: 6) eine stark positive Wirkung auf die Aufnahme der siRNA. Wie bei der Beschreibung zu Fig. 4 gezeigt werden soll, ist diese positive Wirkung allein auf die Modifikation des Nukleinsäure-Rückgrates zurückzuführen.

Fig. 3 zeigt, dass die durch Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide vermittelte Aufnahme von si2B nicht von der Sequenz der Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide abhängig ist. Für diesen Versuch wurde die Wirkung von vier mit 24 Basen gleichlangen Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotiden, nämlich das Tetramer des Hexamermotivs 5'-(TCGTGT)<sub>n</sub>-3'; n=4 und die randomisierten Sequenzen Nov 2009 AAAA, ODN 2006 und S0K27(24), auf die zelluläre Aufnahme von si2B nach den unter Fig. 2 beschriebenen Bedingungen untersucht.

Zwischen den in ihrer Sequenz sehr unterschiedlichen Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden TeH, ODN 2006 und S0K27(24) sind keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Wirkung der zellulären Aufnahme von si2B erkennbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die durch Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide vermittelte Aufnahme von Nukleinsäurewirkstoffen unabhängig von der Sequenz der Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide ist.

Fig. 4 zeigt, dass die Transportaktivität der Phosphorothioat-Oligonukleotide von der Chemie des Nukleinsäure-Rückgrates der Phosphorothioat-Oligonukleotide abhängig ist. Während Oligonukleotide mit einem Ribonukleinsäure- oder Desoxyribonukleinsäure-Rückgrat keinen oder nur schwachen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von si2B haben, zeigen dieselben Sequenzen mit Phosphorothioat-modifiziertem Nukleinsäurerückgrat einen signifikanten Anstieg der Aufnahme von si2B.

Fig. 5 zeigt die Abhängigkeit der durch Phosphorothioat-Oligonukleotide vermittelten Aufnahme von siRNA von der Konzentration der Phosphorothioat-Oligonukleotide. Im Unterschied zu den vorhergehenden Experimenten wurden für dieses Experiment nach oben stehendem Versuchsaufbau 400.000 ECV-Zellen verwendet, die mit einer Konzentration von

200 nm si2B und aufsteigender Konzentration von Phosphorothioat-modifiziertem HHex inkubiert wurden.

Die Ergebnisse des in Fig. 6 gezeigten Experiments legen am Beispiel des Phosphorothioat-modifizierten nahe, dass die Wirkung der Phosphorothioat-Oligonukleotide mit steigender Kettenlänge zunimmt.

Für das in Fig. 7 abgebildete Experiment wurden primäre HUVEC-Zellen 48 h vor Beginn des Experiments in einer 12 Well Platte in RPMI1640 mit 10%FKS und EGF ausgebracht. Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit den Inkubationslösungen (siRNA + T-ON in OptiMEM) überschichtet und über Nacht bei 37 °C, 5%-CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei den Zellen mit der 20 stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen nach 14 h mit RPMI1640 mit 10% FKS überschichtet und für weitere 6 h bei 37°C / 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten erfolgte die RNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Der Nachweis der aufgenommenen siRNA erfolgte mittels Liquid-Hybridisierung. Wie auch Fig. 4 zeigt Fig. 7, dass die Transportaktivität der Phosphorothioat-Oligonukleotide von der Chemie des Nukleinsäure-Rückgrates der Phosphorothioat-Oligonukleotide abhängig ist. Während Nukleinsäuren mit einem DNA-Rückgrat nur einen geringen Einfluss auf die Transportaktivität von si2B haben, zeigt das vollständig Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure-Rückgrat von HHex eine verbesserte zelluläre Aufnahme von si2B. Dieses gilt für die Inkubation sowohl über 14 h als auch über 20 h.

Fig. 8 zeigt die apparente biologische Wirksamkeit der siRNA und damit auch die gesteigerte Wirksamkeit durch die Transportaktivität der Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide. Das in Fig. 8 abgebildete Experiment folgt zunächst den Arbeitsanweisungen der Figurenbeschreibung zu Fig. 7. Daraufhin wurde die RNA in 30 µl Hybrdisierungslösung (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4) resuspendiert. 10 µl dieser Lösung wurden mit Superscript II (Invitrogen) revers transkribiert und die cDNA für den Nachweis von ICAM-1 mRNA und GapDH mRNA in eine Q-PCR eingesetzt. Die ICAM-1 mRNA Kopienzahlen wurden auf die GapDH Kontrollen normalisiert.

Die Frage, ob neben der Aufnahme von siRNA auch die Aufnahme von shRNA (small hairpin RNA) durch Inkubation mit Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren gesteigert werden kann, beantwortet das in Fig. 10 abgebildete Experiment. Dazu wurden, entsprechend den methodischen Angaben für Fig. 1, ECV-304-Zellen mit siRNA und shRNA jeweils mit  
5 und ohne Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren inkubiert, wobei die verwendete shRNA die in SEQ ID NO: 10 abgebildete Sequenz und die in Fig. 9 vorhergesagte Struktur besaß.

Fig. 10 zeigt deutlich, dass die durch Phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide vermittelte zelluläre Aufnahme von shRNA gegenüber der zellulären Aufnahme ohne  
10 gleichzeitige Inkubation mit Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden mit in etwa derselben Effektivität wie bei den oben mit siRNA beschriebenen Versuchen gesteigert werden kann.

Dabei ist die Effektivität der durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren vermittelten  
15 Aufnahme von siRNA, wie in Fig. 11 gezeigt, mit einer siRNA-Einschleusung durch Transfektion vergleichbar. In dem gezeigten Experiment wurden 80.000 SKRC-35-Zellen pro Well einer 12 Well-Platte am Vortag des Experiments in RPMI 1640 mit 10 % FKS ausgebracht. Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit den Inkubationslösungen (siRNA jeweils +/- T-ON in OptiMEM) überschichtet und über Nacht  
20 bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transfektion der Zellen in den unterschiedlichen siRNA Konzentrationen erfolgte mit Lipofecetamin 2000 für 4h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit RPMI 1640 mit 10 % FKS überschichtet und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die RNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und der Nachweis der aufgenommenen  
25 siRNA erfolgte mittels der bei der Figurenbeschreibung von Fig.1 beschriebenen Liquid-Hybridisierung.

Fig. 12 schließlich zeigt, dass die durch Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäuren vermittelte Aufnahme von siRNA noch durch Inkubation mit Okadainsäure um mehr als das  
30 Zweifache gesteigert werden kann. Für das gezeigte Experiment wurden 80.000 SKRC-35 Zellen pro Well einer 12 Well Platte am Vortag des Experiments in RPMI 1640 mit 10 % FKS ausgebracht. Nach zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen mit OptiMEM +/- Okadainsäure (Okadaic Acid) überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C, 5 %

CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Inkubationslösung die siRNA +/- T-ON hinzugegeben und für weitere 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die weitere Methodik folgt den bereits beschriebenen Angaben.

## ANSPRÜCHE

1. Verwendung von wenigstens einer ersten, Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure zur Verbesserung der zellulären Aufnahme wenigstens einer zweiten Nukleinsäure.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der Sequenz 5'-(TCGTGT)<sub>n</sub>-3', wobei n eine ganze Zahl ist.
3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 dargestellten Sequenzen.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure an ein biologisch aktives Molekül kovalent gebunden ist.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Antisense-

Nukleinsäuren, Ribozymen, CpG-immunstimulatorischer DNA, Aptameren, siRNA/RNAi, shRNA, DNA und RNA.

6. Pharmazeutische Zubereitung zur Verbesserung der zellulären Aufnahme einer ersten Nukleinsäure, bestehend aus wenigstens einer zweiten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure.
7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der Sequenz 5'-(TCGTGT)<sub>n</sub>-3', wobei n eine ganze Zahl ist.
8. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 dargestellten Sequenzen.
9. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure an ein biologisch aktives Molekül kovalent gebunden ist.
10. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen, CpG-immunstimulatorischer DNA, Aptameren, siRNA/RNAi, shRNA, DNA und RNA.

11. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zubereitung Okadainsäure enthält.
12. Verfahren zur Verbesserung der zellulären Aufnahme einer ersten Nukleinsäure von Zellen in Zellkultur, gekennzeichnet durch Inkubieren der Zellen mit der ersten Nukleinsäure und wenigstens einer zweiten Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäure.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der Sequenz 5'-(TCGTGT)<sub>n</sub>-3', wobei n eine ganze Zahl ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Phosphorothioat-modifizierten Nukleinsäuren der unter SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 dargestellten Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure an ein biologisch aktives Molekül kovalent gebunden ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe von Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen, CpG-immunstimulatorischer DNA, Aptameren, siRNA/RNAi, shRNA, DNA und RNA.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure in Gegenwart von Okadainsäure inkubiert wird.
18. Vektor zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor wenigstens eine Phosphorothioat-modifizierte Nukleinsäure enthält.



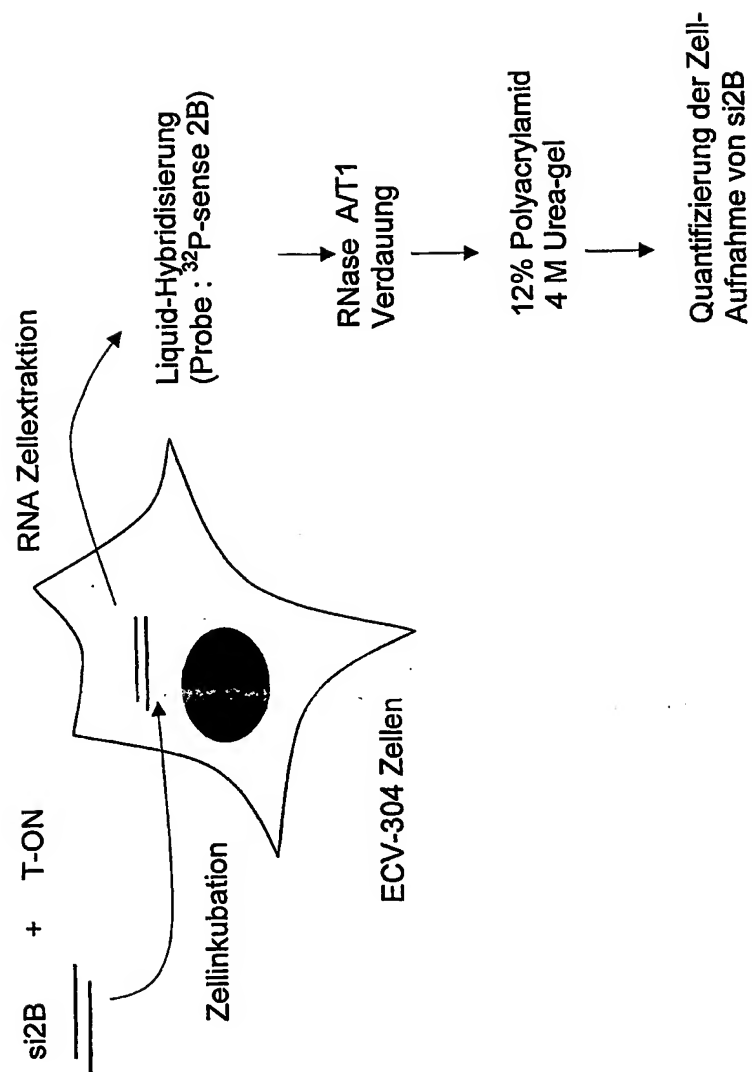


FIG. 1

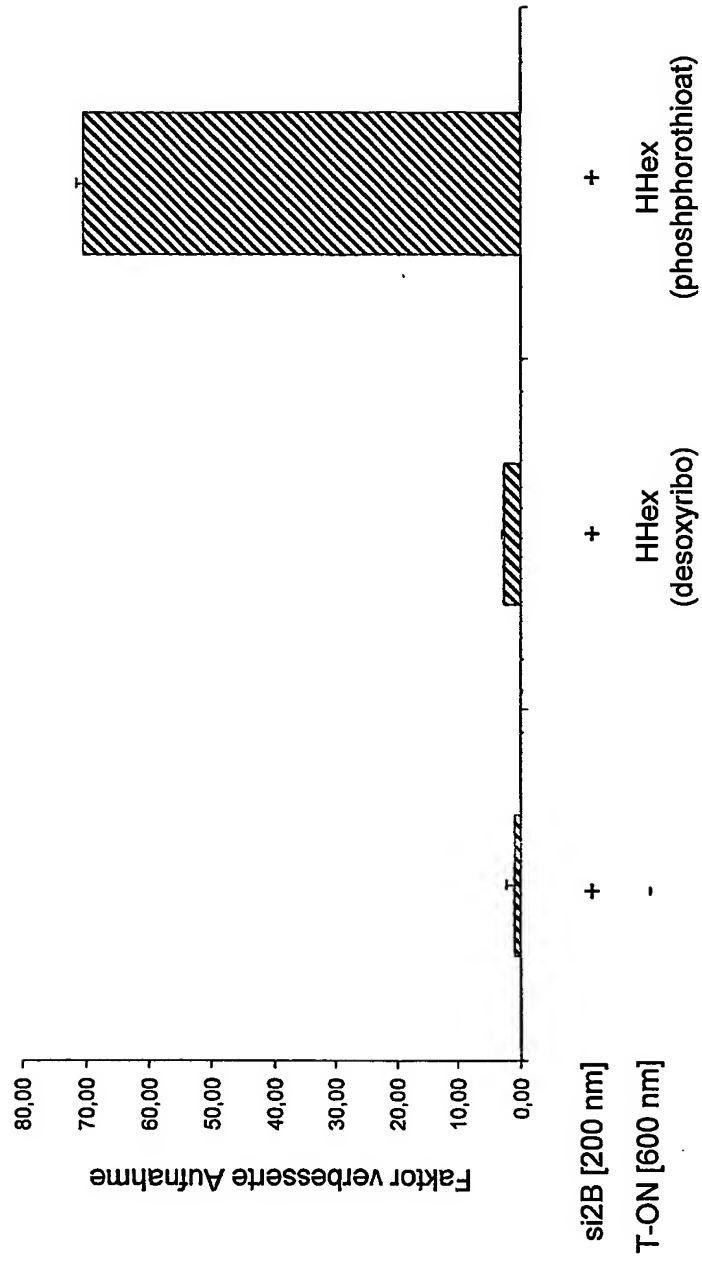


FIG. 2

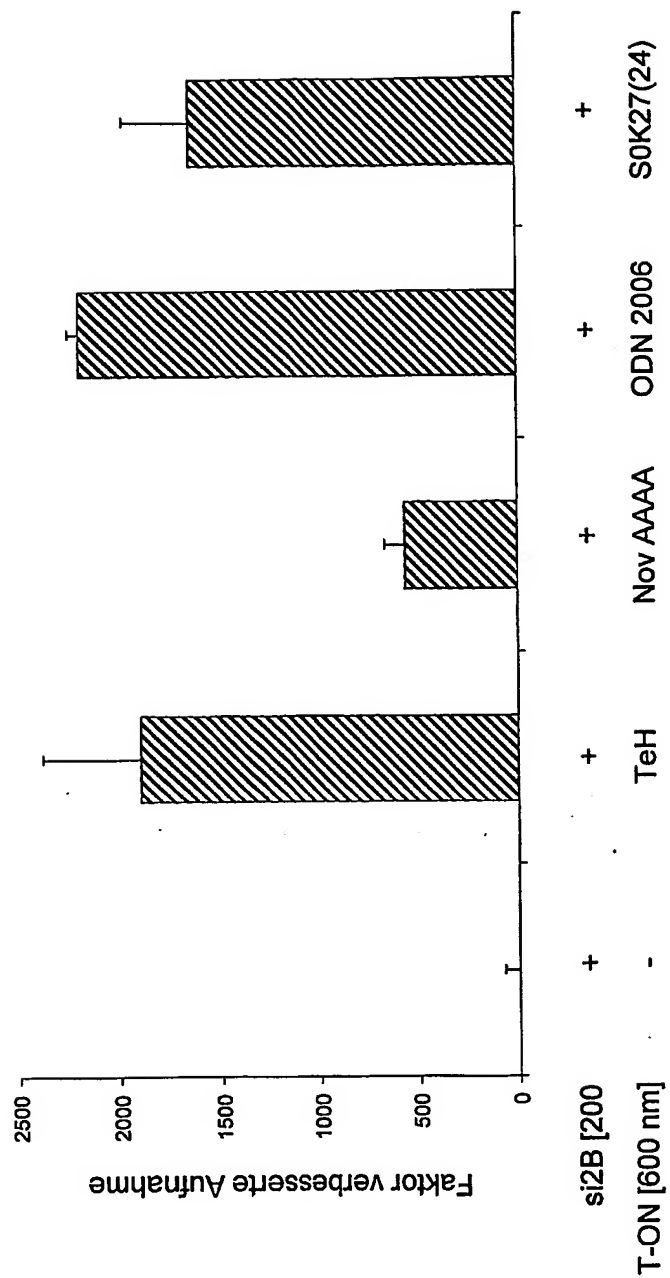


FIG. 3

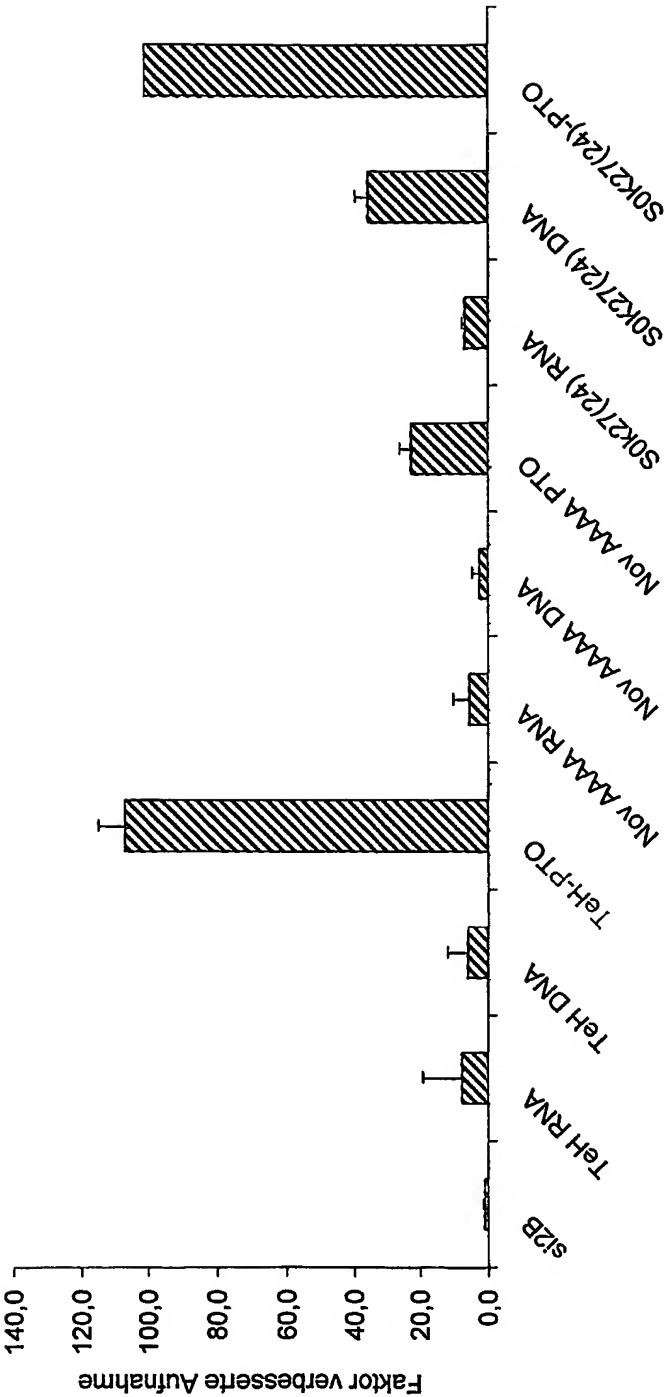


FIG. 4

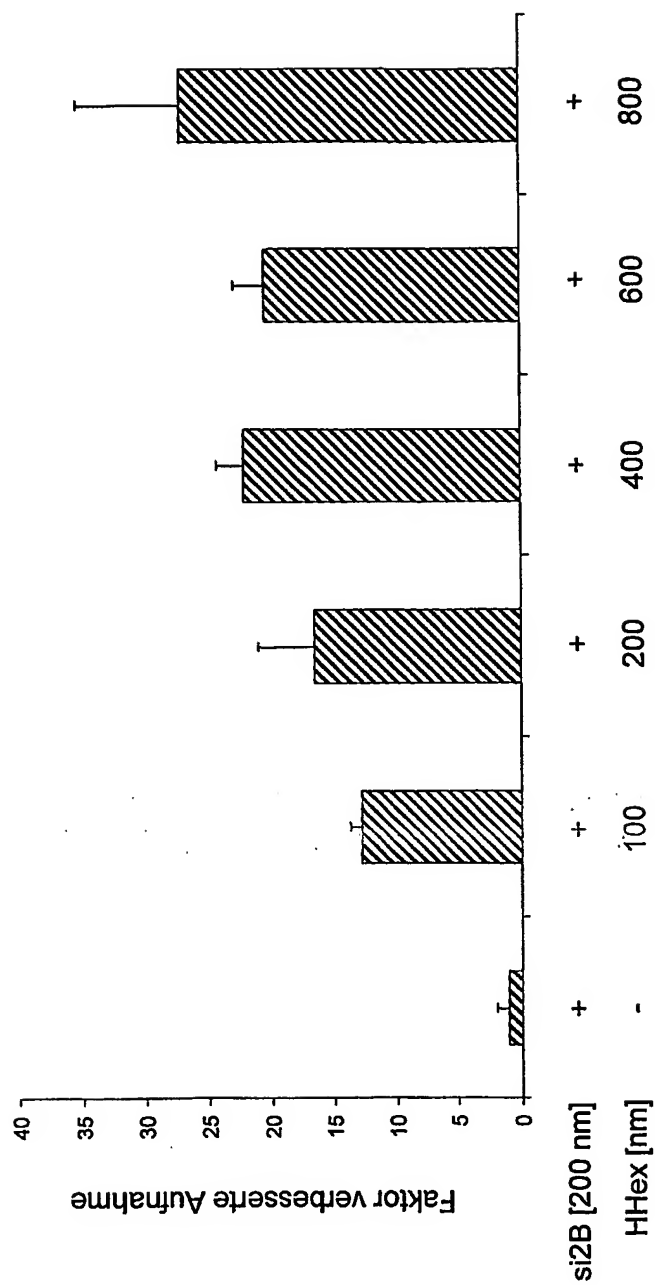


FIG. 5

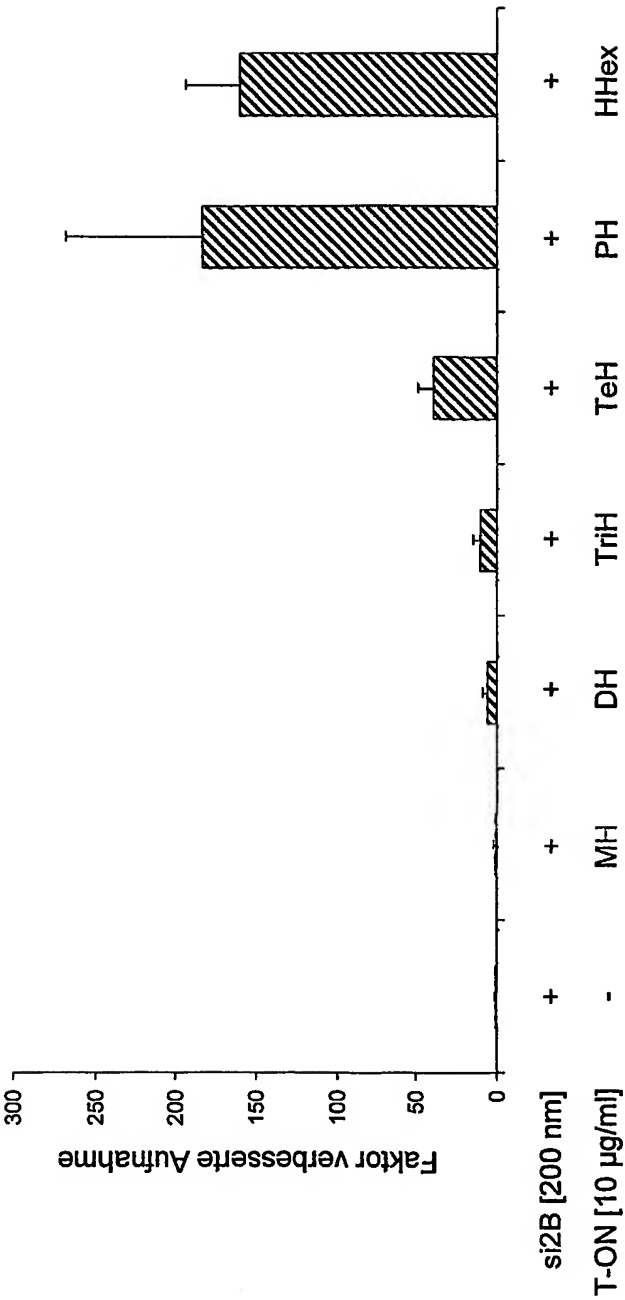


FIG. 6

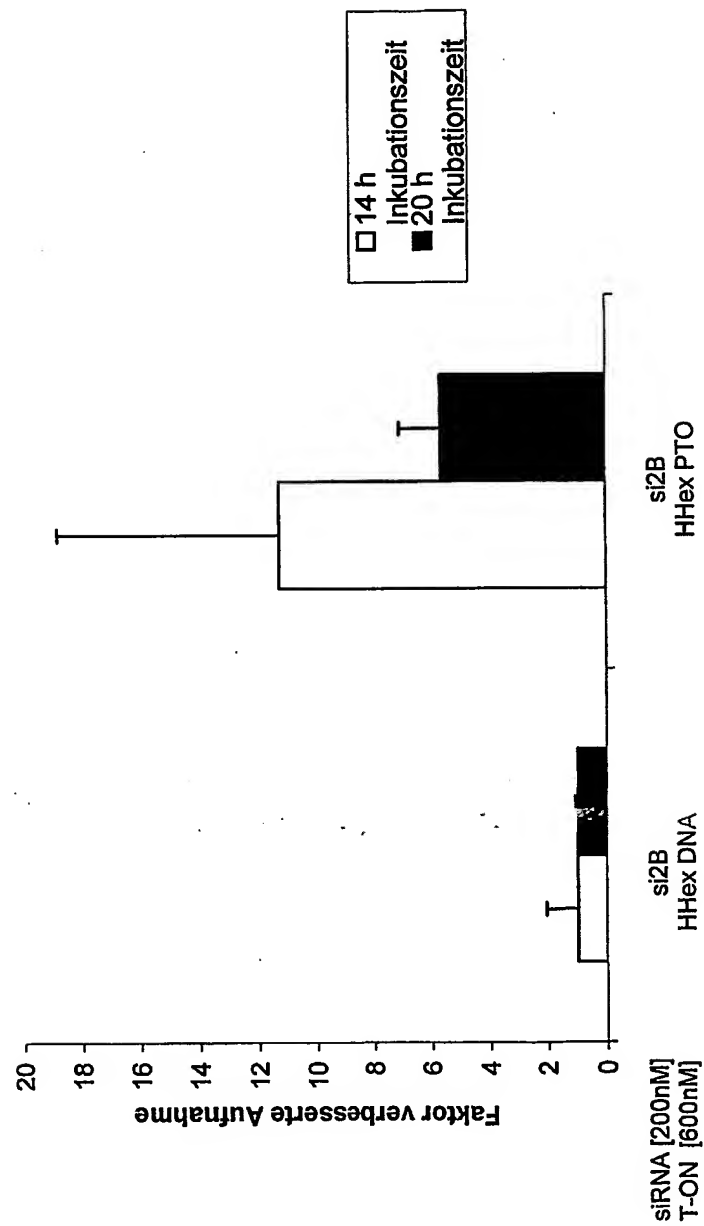


Fig. 7

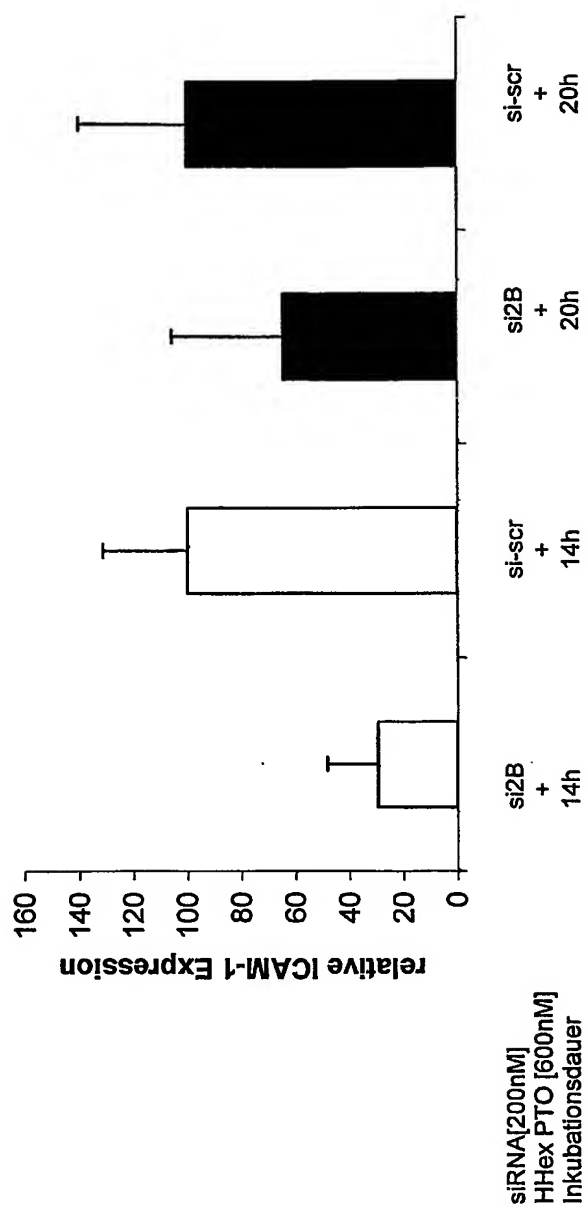
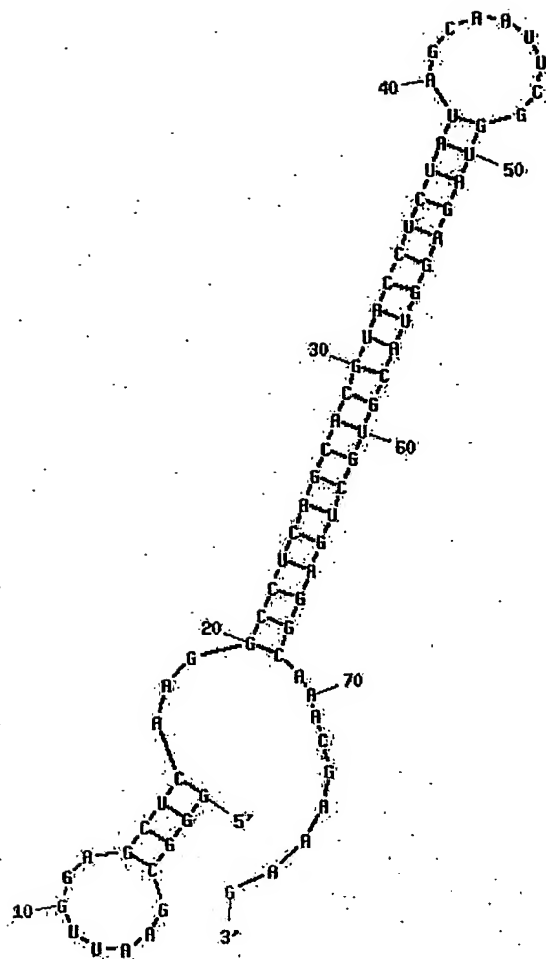
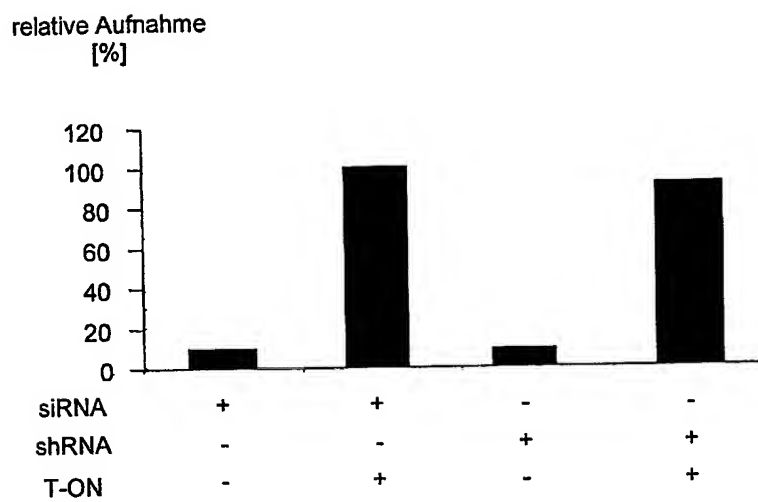


Fig. 8



**FIG. 9**

**FIG. 10**

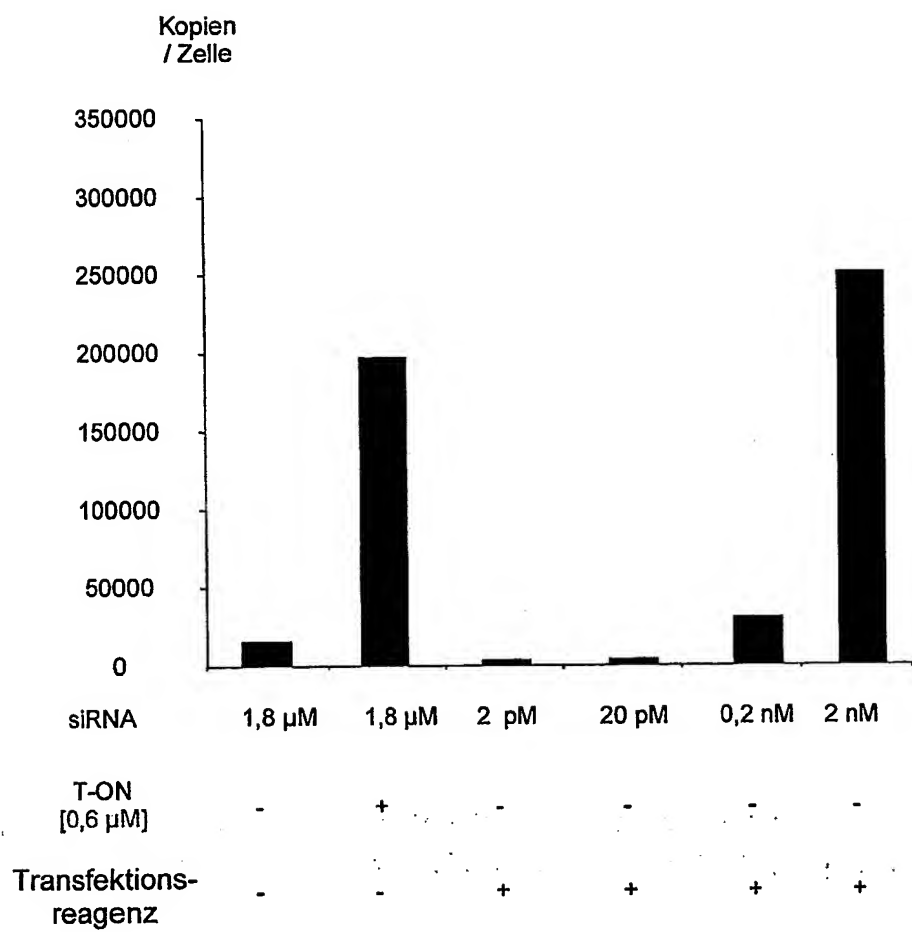


FIG. 11

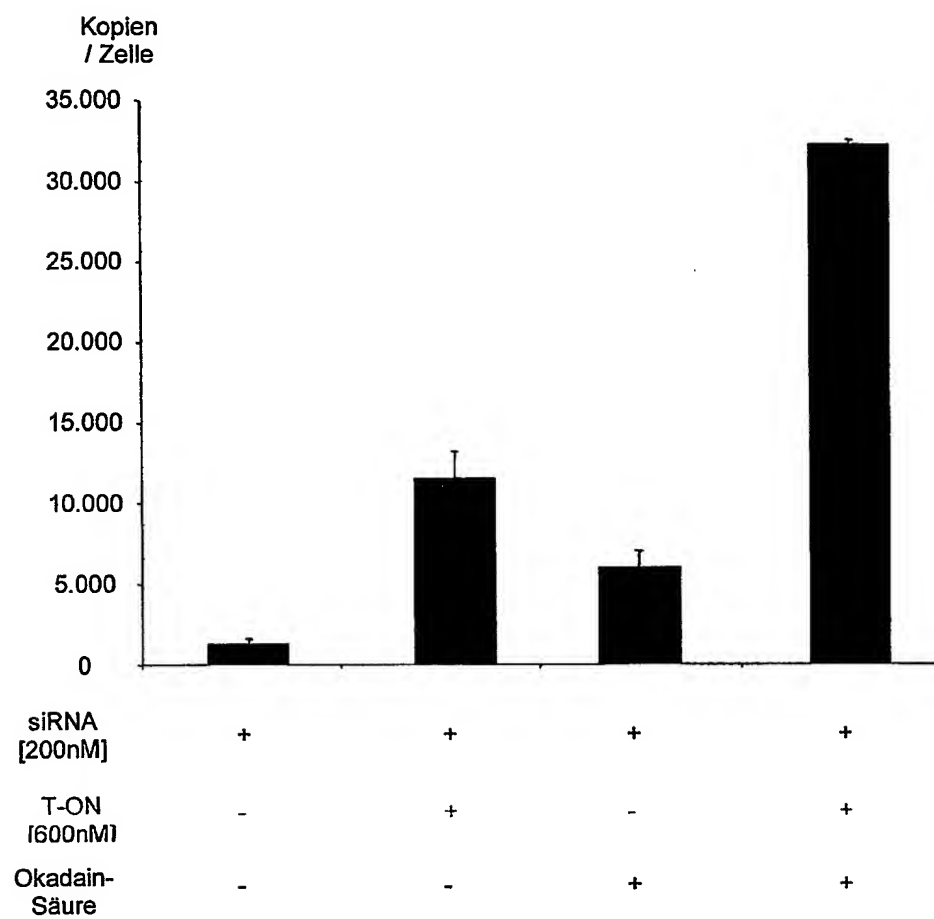


FIG. 12

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitaetsklinikum Schleswig-Holstein

<120> Zellulaere Einschleusung von Nukleinsaewirkstoffen

<130> pva4053

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: MH

<400> 1

tcgtgt

6

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: DH

<400> 2

tcgtgttcgt gt

12

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: TriH

<400> 3

tcgtgttcgt gttcgtgt

18

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: TeH

<400> 4

tcgtgttcgt gttcgtgttc gtgt

24

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: PH

<400> 5

tcgtgttcgt gttcgtgttc gtgttcgtgt

30

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: HHex

<400> 6

tcgtgttcgt gttcgtgttc gtgttcgtgt tcgtgt

36

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: Nov 2009 AAAA

<400> 7

aatcctcccc cagttcaccc aaaa

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: ODN 2006

<400> 8

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Transporter-Oligonukleotid: S0K27(24)



&lt;400&gt; 9

cgggatccat ggcagctgga gata

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; small hairpin RNA

&lt;400&gt; 10

gggcgaauug gagcucaagg ccucagcacg uaccucuauu gcaauucugu agagguacgu

60

gcugaggcaa acgaaag

77

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2005/001404

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/11      C12N15/87      A61K31/713		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K   C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2005/024033 A (UNIVERSITAETSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN CAMPUS LUEBECK; SCZAKIEL, GEO) 17 March 2005 (2005-03-17) page 3, lines 6-33; claims; examples	1-10, 12-16, 18
X	WO 95/03406 A (GEN-PROBE INCORPORATED) 2 February 1995 (1995-02-02) page 13, lines 6-22; claim 44	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*A* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center;">30 November 2005</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center;">12/01/2006</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center;">Friederich, M</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2005/001404

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005024033	A	17-03-2005	NONE	
WO 9503406	A	02-02-1995	AU 689129 B2	26-03-1998
			AU 7550594 A	20-02-1995
			CA 2166890 A1	02-02-1995
			EP 0781332 A2	02-07-1997
			JP 9500787 T	28-01-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen  
PCT/DE2005/001404

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
C12N15/11 C12N15/87 A61K31/713

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 2005/024033 A (UNIVERSITAETSKLINIKUM SCHLESWIG-HOLSTEIN CAMPUS LUEBECK; SCZAKIEL, GEO) 17. März 2005 (2005-03-17) Seite 3, Zeilen 6-33; Ansprüche; Beispiele	1-10, 12-16, 18
X	WO 95/03406 A (GEN-PROBE INCORPORATED) 2. Februar 1995 (1995-02-02) Seite 13, Zeilen 6-22; Anspruch 44	1-18

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*g' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. November 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/01/2006

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Friederich, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001404

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2005024033 A	17-03-2005	KEINE	
WO 9503406 A	02-02-1995	AU 689129 B2	26-03-1998
		AU 7550594 A	20-02-1995
		CA 2166890 A1	02-02-1995
		EP 0781332 A2	02-07-1997
		JP 9500787 T	28-01-1997

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**